



Acta Scientiae Veterinariae. 33(3): 271-275, 2005.

ORIGINAL ARTICLE
Pub. 635ISSN 1678-0345 (Print)
ISSN 1679-9216 (Online)

Estudo antigênico de amostras do vírus da raiva isoladas no Rio Grande do Sul, Brasil

Antigenic studies on rabies virus isolates from the state of Rio Grande do Sul, Brazil

Thais Fumaco Teixeira¹, Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista¹, Eduardo Schmidt² & Paulo Michel Roehle^{1,2}

RESUMO

O vírus da raiva (VR) membro do gênero *Lyssavirus*, família *Rhabdoviridae*, apresenta sete genótipos presentemente identificados, sendo o VR classificado como genótipo 1. Além disso, o VR é o único membro do gênero *Lyssavirus* até o presente identificado na América do Sul. Apesar de ser considerado muito estável antígenoicamente, diferenças têm sido encontradas entre amostras isoladas de diferentes espécies, as quais são denominadas “variantes”. Buscando a identificação de possíveis variantes ou lissavírus de outros genótipos circulantes no Estado do Rio Grande do Sul, foram examinadas 47 amostras de VR isoladas de diferentes espécies (bovinos, morcegos não-hematófagos e equino), coletadas entre janeiro de 2004 e fevereiro de 2005. As amostras foram submetidas à caracterização antigênica com um painel constituído por 12 anticorpos monoclonais (AcMs) dirigidos contra antígenos de lissavírus. Através dessa análise foi possível confirmar que todos os isolados examinados eram membros do genótipo 1. Além disso, foi possível identificar dois grupos antígenoicamente distintos, sendo que o maior deles incluiu a maioria das amostras examinadas (39 de bovinos, 4 de morcegos não hematófagos e uma de equino). Um outro grupo foi constituído por duas amostras isoladas de morcegos não hematófagos e uma terceira, de origem bovina, que apresentava um perfil diferenciado de reatividade antigênica. Tanto as amostras do grupo maior quanto o último acima mencionado apresentaram perfis de reatividade distintos daquele usualmente detectado em amostras de VR de origem de cães domésticos (as quais não têm sido identificadas no Rio Grande do Sul há mais de 15 anos). Essas análises revelam que existem em nosso meio variantes de VR que parecem adaptadas a diferentes hospedeiros naturais. Tais diferenças podem vir a ser úteis como marcadores epidemiológicos.

Descritores: raiva, anticorpos monoclonais, estudo antigênico.

ABSTRACT

Rabies virus (VR) member of the *Lyssavirus* genus, *Rhabdoviridae* family, present seven genotypes presently identify, being the VR classified as genotype 1. Moreover, VR is the only *Lyssavirus* isolated in the South America. Despite the same to be regarded antigenically stable, differences have been found among isolates from distinct species, which are denominated “variants”. In attempting to examine the occurrence of rabies virus (RV) variants or another lissavirus genotype in the State of Rio Grande do Sul, in the present study was examined 47 samples of viruses isolated from different host species (bovine, non-haematophagous bats and equine) between January 2004 to February 2005. The isolates were submitted to antigenic analysis with a panel of 12 monoclonal antibodies (Mabs) directed to *Lyssavirus* antigens. Such analysis allowed to confirm that all isolates were member of genotype 1. Moreover, was possible to distinguish two antigenic groups of variants, the major group included (39 bovine isolates, 4 from non-haematophagous bats and one from a horse). Another group consisted of two non-haematophagous bat isolates as well as one cattle isolate, which had different antigenic characterization. Both groups displayed a Mab reactivity profile distinct from that displayed by dog isolates (which have not been detected in Rio Grande do Sul for more than 15 years). Such antigenic differences reveal that viruses adapted to distinct hosts retain antigenic properties that allow the identification of the origin of the isolate. These are useful epidemiological markers to determine the natural host species for the viruses.

Key words: rabies, monoclonal antibodies, antigenic.

Received: April 2005

www.ufrgs.br/favet/revista

Accepted: July 2005

¹Departamento de Microbiologia, Laboratório de Virologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS. ²FEPAGRO Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul/RS. CORRESPONDÊNCIA: [proeche@ufrgs.br].

INTRODUÇÃO

O vírus da raiva (VR) pertence à família *Rhabdoviridae*, gênero *Lyssavirus* [19]. Até agora são reconhecidos sete genótipos do mesmo [1,2,6] sendo o principal o VR clássico, de distribuição mundial e, atualmente, o único genótipo isolado nas Américas. O VR é mantido na natureza por dois ciclos, ocasionalmente inter-relacionados, o ciclo urbano, associado a cães, e o ciclo silvestre a morcegos, particularmente à espécie hematófaga *Desmodus rotundus* [11]. Na maior parte do Brasil, a raiva urbana ainda é endêmica [5]. Entretanto, outras espécies parecem ser eventualmente envolvidas no ciclo, como é o caso dos morcegos não-hematófagos [4].

O Rio Grande do Sul apresenta um *status* epidemiológico peculiar em relação à raiva, pois não ocorrem casos de raiva urbana há aproximadamente 17 anos. Entretanto, a raiva transmitida por morcegos hematófagos ainda é endêmica no meio rural. Por outro lado, o crescente número de casos de raiva em morcegos não-hematófagos vem chamando a atenção para possíveis alterações na cadeia epidemiológica da infecção. Apesar do VR ser considerado um vírus antigenicamente estável, diferenças entre amostras (“variantes” do vírus) vêm sendo evidenciadas [7,9,12,17]. Na caracterização antigênica de tais variantes, anticorpos monoclonais (AcMs) têm sido amplamente utilizados [3,8,10]. Nesses casos, o perfil de reatividade obtido frente a um painel de AcMs, permite a construção de um “perfil” antigênico, o que viabiliza a comparação entre amostras.

Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização antigênica de amostras de vírus da raiva isoladas no Estado do Rio Grande do Sul, no período de janeiro de 2004 a fevereiro de 2005.

MATERIAIS E MÉTODOS

Quarenta amostras de vírus rábico isoladas de tecido nervoso, além de sete amostras isoladas no Laboratório de Virologia, CCR/UFSM, foram submetidas à caracterização antigênica. Das amostras analisadas, 40 foram isoladas de bovinos, 6 de morcegos não-hematófagos e uma de origem equina. As análises dos perfis de reatividade foram efetuadas com um painel de 12 AcMs dirigidos contra antígenos do nucleocapsídeo de lissavírus [15]. Os AcMs 5A3, 5G2 e 7C1 foram preparados com antígenos da amostra CVS [15]; os AcMs L3, L18 (preparados com antígenos de uma amostra do vírus Lagos Bat), DB1, DB3, DB4 e DB9 (preparados com antígeno de uma amostra de origem de mor-

cego insetívoro isolada na Dinamarca), D3 (preparada com antígenos de uma amostra do vírus Duvenhage) e M11 (preparada com antígenos do vírus Mokola) foram preparados por King [8]. O AcM E5A7 foi preparado por Pantoja [13]. O teste utilizado para as análises dos perfis de reatividade foi a imunofluorescência indireta (IFI), como descrito previamente [8,15]. Lâminas com impressões de encéfalos positivos foram fixadas em acetona a 4°C por 30 min e, após a fixação, incubadas com soro de coelho a 37°C por 30 min em câmara úmida. Posteriormente foram lavadas com PBS (NaCl 0,15M, Na₂HPO₄ 0,07M, KH₂PO₄ 8 mM, H₂O q.s.p. 1L, pH 8,5) e água destilada, secas a temperatura ambiente e sobre elas adicionados os AcMs e os soros controles positivo e negativo. As lâminas foram novamente incubadas a 37°C por 30 min em câmara úmida, lavadas e secas como descrito anteriormente. A seguir, foi adicionado sobre a lâmina uma diluição apropriada de conjugado anti-camundongo/FITC¹. Após a incubação e lavagens, as lâminas foram montadas em glicerol a 50%. As amostras foram definidas como positivas (reação evidenciada por IFI) ou negativas (reação não evidenciada).

RESULTADOS

Quarenta e sete amostras do vírus da raiva foram submetidas à análise antigênica. Oito dos doze AcMs (5A3, 5G2, 7C1, E5A7, L3, DB1 DB3 e DB4) reconheceram epitopos em todos os vírus isolados. Três dos doze AcMs (D3, DB9 e M11) não reagiram com nenhum dos isolados examinados. O AcM L18 não reagiu com epitopos de nenhum isolado exceto dois isolados de morcegos não-hematófagos e um isolado de bovino. Com base na constatação ou não de reatividade frente a esse AcM, os isolados puderam ser divididos em dois grupos (Quadro 1). O primeiro grupo foi constituído por 39 amostras de bovinos, 4 amostras de morcegos não hematófagos e 1 amostra de equino, as quais não reagiram frente ao AcM L18; o segundo grupo pode ser formado com isolados de 2 morcegos não-hematófagos e 1 de origem de um bovino, que reagiram positivamente ao AcM L18.

DISCUSSÃO

Apesar da raiva urbana estar controlada no Rio Grande do Sul, a raiva em bovinos, transmitida essencialmente por morcegos hematófagos, continua endêmica. No presente estudo, quarenta e sete amostras do

Quadro 1. Reatividade das amostras de vírus da raiva frente a um painel de anticorpos monoclonais, detectado por reação de imunofluorescência indireta.

Isolados	Anticorpos Monoclonais											
	5A3	5G2	7C1	E5A7	L3	DB1	DB3	DB4	L18	D3	DB9	M11
PG 1844/04 ^c , PG 2077/04 ^c PG 1097/04 AP 847	+ ^a	+	+	+	+	+	+	+	+	- ^b	-	-
PG 035/04, PG 81/04 PG 90/04, PG 509/04 PG 978/04 ^d PG 1097/04 N 473 PG 1116/04 N 481 PG 1116/04 N 482 PG 1116/04 N 483 PG 1116/04 AP 848 PG 1150/04, PG 1202/04 PG 1216/04 01 PG 1216/04 05 PG 1230/04 07 PG 1230/04 08 PG 1265/04, PG 1482/04 PG 1486/04 AP 1072-04 PG 1486/04 AP 1073-04 PG 1569/04 01 PG 1569/04 02 PG 1578/04, PG 1616/04 PG 1737/04, PG 1839/04 PG 1872/04, PG 2204/04 PG 2228/04 SV 376/04 PG 2228/04 SV 377/04 PG 121/04 ^c , PG 227/04 ^c PG 386/04, PG 77/05 1.1 ^c PG 77/05 1.2 ^c , PG 93/05 PG 294/05, SV 438/04 ^e SV 198/04 ^e , SV 662/03 ^e SV 422/04 ^e , SV 851/03 ^e SV 218/04 ^e , 472/04 ^e	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

^a(+) Reação positiva; ^b(-) Reação negativa; ^cMorcegos insetívoros; ^dEquino; ^eAmostras doadas pelo Dr. Rudi Weiblen, CCR/UFSM.

vírus da raiva foram submetidas à análise antigênica, sendo identificadas duas possíveis variantes do vírus. O grupo constituído pela variante mais frequentemente identificada foi constituído por 39 amostras de bovinos, 4 mostras de morcegos não hematófagos e 1 amostra de equino, as quais apresentaram o mesmo perfil identificado em amostras de morcegos hematófagos em estudos prévios [16]. Estes dados são coerentes, uma vez que o morcego hematófago *Desmodus rotundus* é a principal fonte de infecção para herbívoros. A reação positiva frente ao AcM L18 permitiu identificar diferenças antigênicas em três amostras isoladas, sendo uma de origem bovina e duas de origem de morcegos não hematófagos, das espécies *Tadarida brasiliensis* e *Myotis nigricans*. Embora a única diferença antigênica detectável tenha sido a reatividade frente a um dos AcMs utilizados, isso não deve causar surpresa, uma vez que as diferenças entre variantes em um mesmo genótipo são

pequenas. Como exemplo, com o painel de AcMs utilizado, apenas dois deles - AcMs DB3 e DB4 - são suficientes para diferenciar amostras de VR de origem canina e bovina [17]. Tais variações antigênicas podem ser posteriormente confirmadas através de reações de transcrição reversa seguida de amplificação pela reação da polimerase em cadeia (RT/PCR) e/ou por análises com enzimas de restrição [17].

É importante salientar que os perfis antigênicos detectados são bastante estáveis, pois mesmo após uma passagem do vírus no hospedeiro acidental (tal como é o caso de amostras de origem de morcegos hematófagos em bovinos) ou inoculação experimental em camundongos, os resultados dos testes se mantêm inalterados. Portanto, tais variações parecem importantes, podendo ser indicativas de uma busca de adaptação do vírus à espécie hospedeira. Como exemplo, evidências recentes têm sugerido que o ciclo biológico da raiva em

morcegos não hematófagos é distinto daquele em morcegos hematófagos, apesar de ocasionalmente essas espécies ocuparem o mesmo abrigo, embora em locais separados e independentes. As diferenças antigênicas aqui observadas podem, portanto, representar um aspecto desse esforço adaptativo.

Os resultados aqui obtidos confirmam a não ocorrência de amostras de VR com perfil indicativo de origem canina no Estado. Esse fato salienta também a importância deste tipo de estudo como instrumento de apoio à análise epidemiológica [18] a fim de permitir um controle mais preciso da raiva urbana no RS. No passado, em estudo prévio realizado na região [14], era impossível correlacionar amostras de VR com os possíveis hospedeiros de origem. Atualmente, tal correlação não só é possível como pode ser utilizada para a orientação de condutas visando o controle e eliminação de focos [18].

A constatação da presença do vírus em morcegos não hematófagos e da possibilidade de que os mesmos estejam endemicamente infectados com o vírus da raiva introduz uma preocupação especial, em vista da possibilidade do contato humano com os mesmos. Por exemplo, o morcego insetívoro *Tadarida brasiliensis* é bastante comum no meio urbano no Brasil e tem sido encontrado ocasionalmente contaminado com raiva, mesmo em grandes cidades onde não são encontrados morcegos hematófagos e onde a raiva canina é inexis-

tente. Dessa forma, os cuidados a serem tomados para evitar a contaminação de humanos devem ser revistos, buscando incluir uma maior conscientização sobre o potencial papel de morcegos não hematófagos na transmissão da doença.

CONCLUSÕES

As análises antigênicas com os AcMs aqui empregados são aparentemente capazes de identificar variantes, as quais parecem estar associadas às espécies de origem do vírus, ou seus hospedeiros naturais. Estas variações antigênicas podem ser utilizadas como marcadores epidemiológicos. Foram identificadas duas variantes. Não foram identificadas variantes circulante em cães, uma vez que não ocorrem casos de raiva urbana no Rio Grande do Sul desde 1988. Não obstante, a análise com os AcMs aqui empregados permitiria a identificação de variantes cujo hospedeiro natural fosse o cão doméstico. A disponibilidade de tais testes é importante para o acompanhamento epidemiológico da raiva no Estado.

Agradecimentos. Ao Prof. Dr. Rudi Weiblen, Laboratório de Virologia, CCR/UFSM, Santa Maria, RS/Brasil, pelas amostras cedidas. TFT, HBCRB e PMR são bolsistas do CNPq. Apoio financeiro CNPq, FEPAGRO; FAPERGS, FINEP.

NOTAS INFORMATIVAS

¹Dako, Glostrup, Dinamarca.

REFERÊNCIAS

- 1 Amengual B., Whitby J.E., King A., Cobo J.S. & Bourhy H. 1997. Evolution of european bat lyssavirus. *Journal of General Virology*. 78: 2319-2328.
- 2 Bourhy H., Kissi B. & Tordo N. 1993. Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*. 194: 70-81.
- 3 Delpietro H.A., Hurí-Dhomen F., Larghi O.P., Mena-Segura C. & Abramo L. 1997. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin. *Journal of Veterinary Medicine*. B44: 477-483.
- 4 Germano P.M.L. 1994. Avanços na pesquisa da raiva. *Revista de Saúde Pública*. 28: 86-91.
- 5 Germano P.M.L., Silvia E.V., Miguel O. & Sureau P. 1990. Variantes antigênicas Del vírus de la rabia aisladas en el Nordeste y Sudeste Del Brasil. Estudo Preliminar. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 108: 39-45.
- 6 Gold A.R., Hyatt A.D., Lunt R., Kattenbelt J.A., Hengstberger S. & Blacksell S.D. 1998. Characterization of a novel lyssavirus isolated from pteropid bats in Australia. *Virus Research*. 54: 165-187.
- 7 Ito M., Arai Y.T., Itou T., Sakai T., Ito F.H., Takasaki T. & Kurane I. 2001. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: Identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology*. 284: 214-222.
- 8 King A.A. 1991. Studies of the antigenic relationships of rabies and rabies-related viruses using anti-nucleoprotein monoclonal antibodies. 124p. Guilford, U.K. Dissertation, University of Surrey.
- 9 Loza-Rubio E., Aguilar-Setién A., Bahloul C., Brochier B., Pastoret P.P. & Tordo N. 1999. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. *Archives of Medical Research*. 30: 144-149.
- 10 Loza-Rubio E., Vargas R., Hernandez E., Batalla D. & Aguillar A. 1996. Investigation of virus rabies strains in México with a panel of monoclonal antibodies used to classify lyssavirus. *Bulletin of the Pan American Health Organization*. 30: 31-35.
- 11 Manual Técnico do Instituto Pasteur. 1998. Controle da raiva dos herbívoros. São Paulo. v.1. Instituto Pasteur, 15p.

- 12 **Páez A., Nuñez C., García C. & Bóshell J. 2003.** Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. *Journal of General Virology*. 84: 795-802.
- 13 **Pantoja L.D. 1995.** Caracterização de amostras brasileiras de vírus rábico com anticorpos monoclonais. 96f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 14 **Roehe P.M., Cunha A.C., Rodrigues R.R., Gonçalves A.R. & Ribeiro C.L.G. 1987.** Diagnóstico laboratorial da raiva no Rio Grande do Sul, Brasil. *Boletim de la Oficina Sanitaria Panamericana*. 102: 464-475.
- 15 **Schaefer R. 1999.** Produção de anticorpos monoclonais contra vírus rábico de origem bovina e caracterização de amostras. 70f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 16 **Schaefer R. 2004.** Estudos antigênicos e moleculares de amostras brasileiras do vírus da raiva e construção de um herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) contendo a glicoproteína do vírus da raiva. 96f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 17 **Schaefer R., Batista H.B.C., Franco A.C., Rijsewijk F.A.M. & Roehe P.M. 2005.** Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Veterinary Microbiology*. 107: 161-170.
- 18 **Schaefer R., Caldas E., Schmidt E., King A.A. & Roehe P.M. 2002.** First case of cat rabies in southern Brazil for 11 years. *Veterinary Record*. 150: 216-217.
- 19 **Tordo N. 1996.** Characteristics and molecular biology of rabies vírus. In: Meslin F.X., Kaplan M.M. & Koprowski H. (Eds). *Laboratory Techniques in Rabies*. 4th edn. Geneva: World Health Organization, pp.28-51.